人类线粒体肌酸激酶 uMtCK 的底物结合位点分析

孟浩毅 [1†]　李丹阳 [3†]　孙正阳 [1]　杨兆勇 [3]　张志斐 [2*]　袁丽杰 [1*]

（1.华北理工大学基础医学院，河北省慢性疾病重点实验室，唐山市慢性病临床基础研究重点实验室，河北唐山，063000；2. 华北理工大学药学院，河北唐山，063000；3.中国医学科学院医药生物技术研究所，北京，100050）

摘要：研究人类线粒体肌酸激酶 uMtCK 的结合位点，将其与底物肌酸和 ATP 结合有关的关键氨基酸进行突变，并对突变体进行酶动力学和圆二色谱数据分析，探讨这些关键氨基酸在底物识别和催化过程中的作用。结果显示，与野生酶相比，突变体 Q313A 和 R336A 的 K_m^{Cr} 分别提高了 2.6 和 2.9 倍，k_{cat} 下降了 19%和 55%；同样地，与 ATP 结合相关的突变体 R125A 和 R287A 分别使得 K_m^{ATP} 升高了 3.2 和 4.2，k_{cat} 下降了 72%和 38%。以上结果表明突变体 R125A、R287A、Q313A 和 R336A 影响对底物的结合，同时也降低了酶促反应的速度。利用圆二色谱比较野生酶与不同突变体的二级结构并无明显变化，但进一步的结构模拟表明底物结合位点氨基酸在与底物之间的氢键对底物的识别和酶催化过程中发挥着重要作用。

关键词：肌酸激酶；定点突变；酶动力学；结构模拟

Substrate-binding Site of Ubiquitous Mitochondrial Creatine Kinase from *Homo sapiens*

MENG Hao-yi[1†]　LI Dan-yang[3†]　SUN Zheng-yang[1]　YANG Zhao-yong[3]　ZHANG Zhi-fei [2*]

YUAN Li-jie[1*]

（1. Hebei Key Laboratory for Chronic Diseases, Tangshan Key Laboratory for Preclinical and Basic Research on Chronic Diseases, School of basic Medical Science, North China University of Science and Technology, 063210; 2. School of Pharmacy, North China University of Science and Technology, 063000; 3. Institute of Medicinal Biotechnology, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College)

Abstract: To investigate the function of the key residues in the binding site of human uMtCK onto substrate creatine (Cr) and ATP, in this work, nine mutants of human uMtCK were

基因项目：河北省自然科学基金资助项目（C2014209137）；中国医学科学院医学与健康科技创新工程（2016-I2M-3-022，2016-I2M-3-012）

†共同第一作者，*共同通讯作者；
通讯作者：袁丽杰，E-mail：yuanlijie1970@163.com；张志斐，E-mail：zhifeiz@outlook.com;

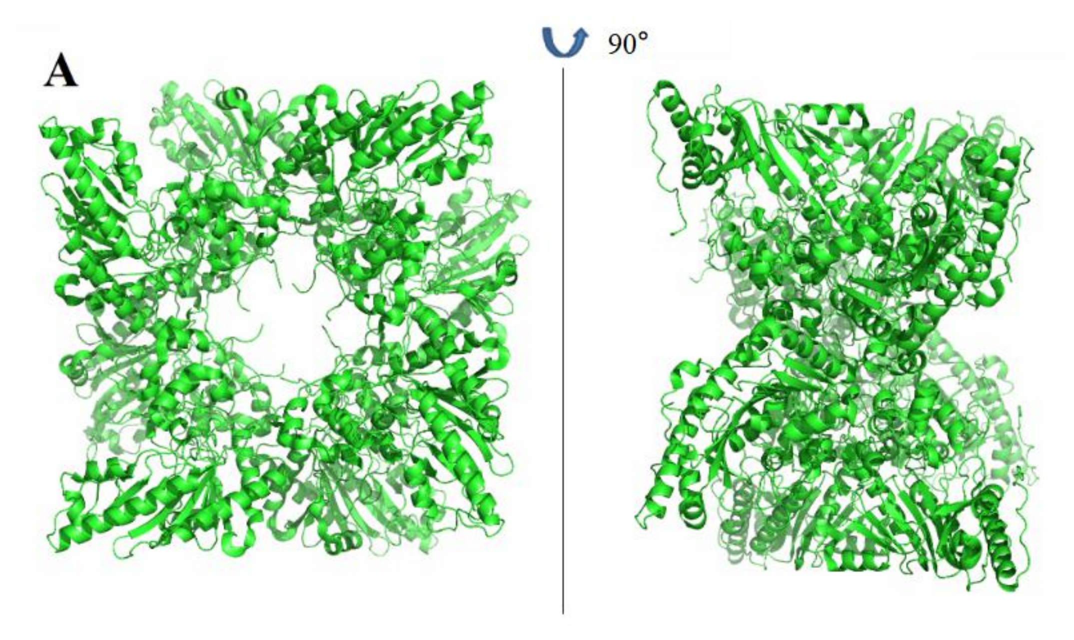
constructed by using site-directed mutagenesis and analyzed by enzyme kinetics, circular dichroism spectra and protein structural simulation. The K_m^{Cr} value of Q313A and R336A and K_m^{ATP} values of R125A and R287A were 2.6, 2.9, 3.2 and 4.2 folds higher than that of the wild-type (WT), and the k_{cat} values of Q313A, R125A, R287A and R336A 19%, 55%, 72% and 38% lower than that of WT, respectively. Meanwhile, no significant changes of circular dichroism spectra of the mutants were observed compared with WT. The structure model analysis indicated that the mutations altered the hydrogen bonds between the key amino acid residues and substrates, thus creating an unfavorable local environment for substrate binding and catalysis, as reflected by the increased K_m and decreased k_{cat} of mutants, consequently inactivation of human uMtCK.

Key words: Creatine Kinase; Site-directed mutagenesis; Enzyme kinetics; Structural simulation

肌酸激酶（Creatine kinase，CK，EC 2.7.3.2）属于磷酸原激酶家族，通过催化可逆的磷酸化反应而在脊椎动物的能量代谢中发挥着重要作用。CK 有四种同工酶形式，包括肌肉型（MM-CK）、脑型（BB-CK）、杂化型（MB-CK）和线粒体型（Mt-CK）[1]，主要存在于脑组织、骨骼肌和心肌中。由于肌酸激酶在细胞能量循环的重要作用，它在调控糖酵解过程[2-4]、吞噬细胞发挥吞噬作用、神经递质的释放[5]和离子跨膜运输等方面具有重要作用。临床上诊断心肌梗死的重要指标之一就是血清中 CK 的含量，而且 CK 也被推定为很多疾病的潜在的临床生物标记物和治疗靶点[1,6]。人类线粒体肌酸激酶（uMtCK）在线粒体的氧化磷酸化反应和细胞凋亡中起着重要的作用[7], 近期研究发现 uMtCK 在胰腺癌和乳腺癌中有着异常的表达[8,9]。

肌酸激酶在不同物种和构型的序列一致性较高，达到 60 %[10]。至今，对于肌酸激酶的结构生物学研究也有许多重要发现，包括 uMtCK[11]在内的 13 个肌酸激酶晶体结构已有报道，其中包括本体[12-15]、ADP-Mg^{2+}复合物[16,17]和 ADP-Mg^{2+}·硝酸根·肌酸过渡态复合物[18-20]。在最初的人源 uMtCK 结构报道中，它由四个“banana-shaped”二聚体组成的八聚体存在（图 1，A），每个单聚体的结构都相似，都包含两个结构域：较小的 N 端结构域（氨基酸残基：1-95，红色）和较大的 C 端结构域（氨基酸残基 120-379，绿色），两个结构域之间由一个 linker 连接（氨基酸残基 96-119，黄色）（图 1，B）。尽管对于人源 uMtCK 的生化和结

构生物学研究已有多个报道，但 uMtCK 的催化机理和底物磷酸的转移过程并未探究清楚。未结合底物的“开放”状态结构并不能给出具有活性酶-底物复合物的详细信息。而且已有研究报道[11]电负性氨基酸 E226、E227 和 D228 对于催化活性是必需氨基酸，但这些氨基酸在催化过程中所发挥的作用并不清楚。过去的 30 年中，大量的研究试图解释 CK 催化机理[21-27]，Milner-White 和 Watts[28]解析 CK 与底物的复合物 CK·ADP-Mg^{2+}·nitrate·creatine 的三维结构（利用硝酸根模拟过渡态中γ-磷酸），这个结构在随后的过渡态类似物复合物研究中也被证实，如人源 BB-CK（PDB 序号：3B6R）[18]、兔源 MM-CK（PDB 序号：1U6R）[20]和太平洋电鳐鱼 MM-CK（PDB 序号：1VRP）[19]，这些底物复合物晶体与无底物结合的晶体相比，显示了与底物结合的关键氨基酸，并提供了在底物结合过程蛋白构象变化的证据。



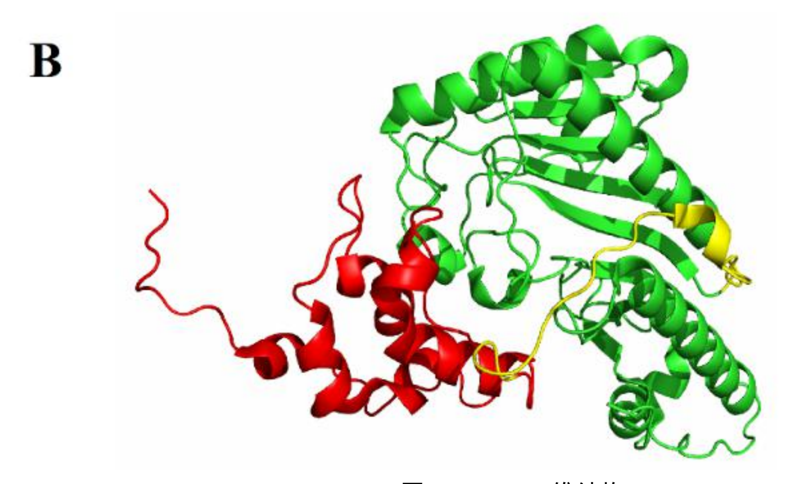


图 1 uMtCK 三维结构

A: uMtCK 八聚体结构；B: N 端结构域（1-95 位氨基酸，红色），C 端结构域（120-379 位氨基酸，绿色），linker（96-119 位氨基酸，黄色）

Fig. 1 The overall structure of uMtCK

A: The crystal structure of uMtCK is formed by an octameric fashion；B: N-terminal domain (residues 1–95, red), C-terminal domain (residues 120–379, green), linker region (residues 96–119, yellow)

前期研究已根据上述过渡态复合物构建了 uMTCK-Mg^{2+}-ATP-creatine 的三维模型。然后利用分子动力学（MD）的方法优化复合物结构，并采用杂化密度泛函理论方法 B3LYP 对 uMTCK 催化作用下的磷酸根迁移反应机理进行研究。研究发现 uMtCK 催化反应分两步，其中 E227 作为催化残基接受肌酸胍基上的质子，去质子化的胍基攻击 ATP 上的高能磷酸基团完成磷酸转移，可逆生成磷酸肌酸和 ADP。但并未对 uMtCK 中关于肌酸和 ATP 的底物结合位点进行详细研究，本文通过野生酶和突变酶的酶动力学、圆二色谱和结构模拟来考量突变位点对于底物结合和催化的影响。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

ATP 和肌酸均购自 Sigma 公司，卡那霉素（Kan）、异丙基-β-D-硫代吡喃半乳糖苷 (IPTG) 购自上海生物工程有限公司。标准分子量蛋白购自康润生物，其余试剂均为国产分析纯；pET-28a(+)和 *Escherichia coil* BL21(DE3)均购自 Novagen 公司。

1.2 培养基

LB 培养基：蛋白胨 10 g/L，酵母膏 5 g/L，NaCl 10 g/L，121 ℃灭菌 15 min；配置固体培养基则加入 1.5 %琼脂。

1.3 uMtCK 突变体的构建

以前期构建的表达 uMtCK 的质粒[29]为模板，采用重叠 PCR[30]的方法进行点突变，引物序列如下表，突变基因经 *Bam*H I 和 *Hin*d III 双酶切后连入 pET-28a(+)，构建重组表达质粒分别命名为 pET-28uMtCK、pET-28uMtCKR125A、pET-28uMtCKR127A、pET-28uMtCKE227A、pET-28uMtCKR231A、pET-28uMtCKR287A、pET-28uMtCKQ313A、pET-28uMtCKR315A、pET-28uMtCKV320A、pET-28uMtCKD330A、pET-28uMtCKR336A，转入 BL21(DE3)后进行可溶性表达。

表 1 定点突变设计的引物

Table 1 Primer used for construction of site-directed mutations

引物名称	引物序列（5’→3’)	引物名称	引物序列（5’→3’)
ck-R125A-F	GTCCTGAGCTCTGCCGTGCGTACCG	ck-Q313A-F	CCTGCGCCTGGCCAAGCGTGGTAC
ck-R125A-R	CGGTACGCACGGCAGAGCTCAGGAC	ck-Q313A-R	GTACCACGCTTGGCCAGGCGCAGG
ck-R127A-F	GCTCTCGCGTGGCTACCGGTCGTAG	ck-R315A-F	GCCTGCAAAAGGCAGGTACCGGCGG
ck-R127A-R	CTACGACCGGTAGCCACGCGAGAGC	ck-R315A-R	CCGCCGGTACCTGCCTTTTGCAGGC
ck-E227A-F	CTGGGTGAACGAAGCAGATCACACC	ck-V320A-F	GGTACCGGCGGTGCCGACACCGCAG
ck-E227A-R	GGTGTGATCTGCTTCGTTCACCCAG	ck-V320A-R	CTGCGGTGTCGGCACCGCCGGTACC
ck-R231A-F	GAAGATCACACCGCCGTTATCTCC	ck-D330A-F	CGGTGTGTTCGCCATCAGTAACCTG
ck-R231A-R	GGAGATAACGGCGGTGTGATCTTC	ck-D330A-R	CAGGTTACTGATGGCGAACACACCG
ck-R287A-F	TACGGGTCTGGCTGCAGGTGTGC	ck-R336A-F	GTAACCTGGACGCACTGGGCAAATC
ck-R287A-R	GCACACCTGCAGCCAGACCCGTA	ck-R336A-R	GATTTGCCCAGTGCGTCCAGGTTAC

1.4 重组蛋白的表达与纯化

将实验室前期构建好的表达 uMtCK 野生酶和突变酶的表达菌株接种在 LB 培养基（Kan 终浓度为 50 μg mL^{-1}），37 ℃，200 rpm 培养到 OD_{600} 值为 0.8-1.0，然后加入终浓度为 0.2 mM IPTG，18 ℃，200 rpm 诱导过夜。将诱导后的培养物 4000 rpm，4 ℃离心 10 min，收集菌体用 Lysis buffer（20 mM 磷酸缓冲液，500 mM NaCl，10 mM 咪唑，pH 7.4）重悬，经高压均质机破碎后，18000 rpm，4 ℃离心 30 min，收集上清。

1.5 uMtCK 及突变酶的纯化

pET-28a(+)带有 His_6 标签，因此选用 TALON® Metal Affinity Resin 来进行第一步纯化，纯化过程如下：将破碎上清用 0.45 μm 滤膜过滤，然后注入经 Lysis buffer 平衡的亲合层析住，并将滤出液重复上样一次；随后用 Washing buffer（20 mM 磷酸缓冲液，500 mM NaCl，20 mM 咪唑，pH 7.4）5 倍柱体积冲洗，最后用 Elution buffer（20 mM 磷酸缓冲液，500 mM NaCl，500 mM 咪唑，pH 7.4）洗脱目的蛋白。随后将洗脱的蛋白在 30 K 超滤浓缩管(Millipore，USA)进行脱盐浓缩，选用分子排阻色谱 Superdex 75 10/300 GL 柱（GE）进行第二步纯化，流

速为 0.5 mL/min，色谱分离过程中采用 280 nm 检测蛋白洗脱情况，每 1mL/管收集洗脱峰，经 SDS-PAGE 检测后，选取有单一目的条带的蛋白超滤浓缩后以备后续实验使用。

1.6 uMtCK 及其突变体的活性分析

1.6.1 uMtCK 及其突变体的活性测定

uMtCK 的活性测定使用肌酸激酶活性测定试剂盒（南京建成），根据肌酸激酶反应原理，通过在 30 °C，660 nm 下测定磷钼酸盐显色来表征活性。

1.6.2 uMtCK 及其突变体的动力学参数测定

（1）K_m^{Cr} 值的测定

以不同浓度肌酸（1 mM、2 mM、5 mM、10 mM、15 mM、20 mM 和 30 mM），5 mM ATP 为底物，50 mM Tris（pH7.5）缓冲体系，加入纯化的重组酶液。在不同底物浓度的反应体系中 37 ℃下反应 5 min，酶标仪记录其在λ_{660nm}下的吸光值，用比色法测定λ_{660nm}水解产物磷酸的含量，通过软件 GraphPad Prism v5.0 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA)中 Michaelis-Menten 方程以计算酶反应的 V_{max} 和 K_m。

（2）K_m^{ATP} 值的测定

以不同浓度 ATP（0.1 mM、0.2 mM、0.4 mM、0.8 mM、1.6 mM、4 mM 和 8 mM）和 25 mM Cr 为底物，在 50 mM Tris（pH 7.5），5 mM Mg^{2+}和 2 mM DTT 下加入适量 uMtCK，其余测定过程同上。

（3）催化常数 k_{cat} 值的测定

已知酶浓度，根据测得的 V_{max} 值以及公式 1-1 计算 k_{cat} 值。

$$V_{max}=k_{cat}[E] \qquad 式(1-1)$$

式中：[E]代表酶的浓度。

1.6.3 uMtCK 及其突变体酶学性质的研究

（1）温度对酶活力的影响

最适反应温度的测定：uMtCK 在不同温度（20 ℃、30 ℃、40 ℃、50 ℃和 60 ℃），pH 7.5 的条件下测定突变体纯化酶液的酶活，将最高活力定为 100%。

（2） pH 对酶活力的影响

最适反应 pH 的测定：在不同 pH 值（4.0、5.0、6.0、7.0、8.0 和 9.0），40 °C 的下测定突变体纯化酶液的酶活，将测得的最高活力定为 100%。

1.7 uMtCK 及其突变体圆二色谱的测定

测定条件为：谱带宽度 1.00 nm，响应时间 0.5 s，扫描速度 100 nm/min，分辨率 1 nm。野生酶及突变酶浓度为 0.1 mg/mL，缓冲溶液为 20 mM PBS，pH 7.5；取待测溶液，置于光径 0.1 cm 的石英样品池中，于远紫外区(190−260 nm)测定，重复扫描 3 次，取平均结果，记录二级结构图谱。

2 结果与讨论

2.1 序列分析

对来源于人类线粒体的 uMtCK[11]、兔子肌肉的 RmCK[12]、*Torpedo californica* 的 TcCK[19]、牛视网膜的 BrCK[15]、人类脑型 hBBCK[18]和人类线粒体的 MibCK[13]进行了序列比对（图 2），发现这 6 个不同来源的 CK 序列相似度在 70%以上，并且肌酸底物结合位点（R127、E227、Q313 和 R336）和 ATP 底物结合位点（R125、R127、R231、R287、R315、V320 和 D330）的氨基酸在不同来源的序列中高度保守。

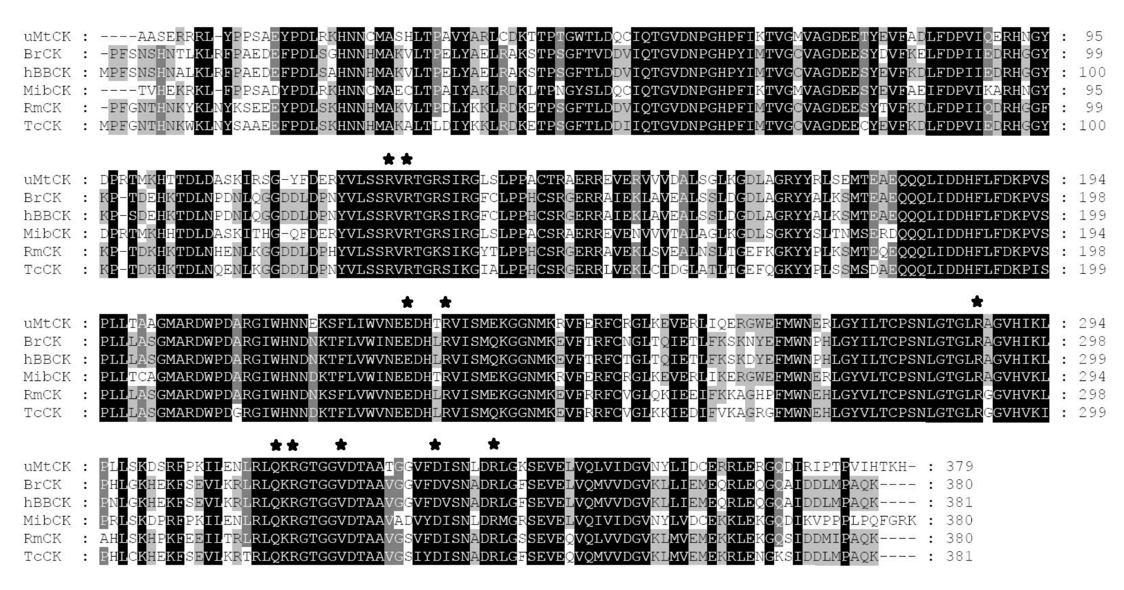


图 2 CK 的同源序列比对

注：星号为 uMtCK 的肌酸和 ATP 的结合位点

Fig. 2 Amino acid sequence alignment of CKs

Note: The residues of uMtCK interacting with the binding site of the creatine and ATP are marked with stars.

2.2 uMtCK 及其突变体的表达与纯化

通过重组质粒转化，成功表达全长的 uMtCK 及其突变体的重组细菌，在 37 ℃，200 rpm 的条件下，培养至 OD_{600} 达到 0.8-1.0 之间，即加入终浓度为 0.2 mM 的 IPTG，在 20 ℃，12 h 条件下诱导目的蛋白表达，在这需指出，当诱导温度高于 30 ℃时，得到的大部分目的蛋白为包涵体，最佳的诱导温度为 16-22 ℃之间。得到的发酵液经破碎和离心后，利用 Co^{2+}亲和树脂填料进行第一步纯化，然后对洗脱的蛋白离心浓缩后选用分子排阻色谱 Superdex 75 10/300 GL 柱进行第二步纯化，经 SDS-PAGE 检测后将纯度较高的目的蛋白样品离心浓缩以备后续使用（图 3）。

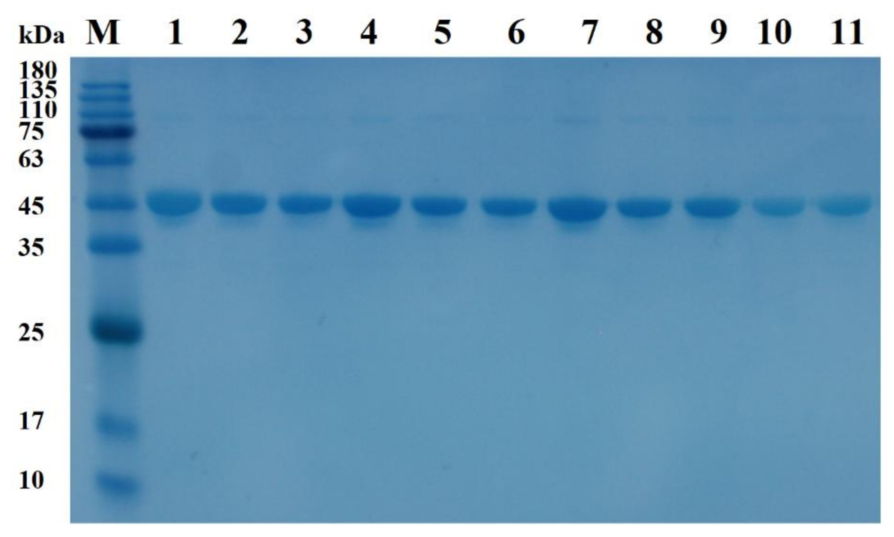


图 3 uMtCK 及其突变体的表达与纯化

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of purified recombinant uMtCK and mutants.

M: Protein Marker; 1-11: uMtCK, uMtCKR125A, uMtCKR127A, uMtCKE227A, uMtCKR231A, uMtCKR287A, uMtCKQ313A, uMtCKV320A, uMtCKR315A, uMtCKD330A , uMtCKR336A

2.3 uMtCK 及其突变体酶学性质分析

前期通过与过渡态类似物复合物（PDB 序号：1U6R 和 1VRP）三维结构比对得到底物小分子的空间位置信息，将 ATP、Mg^{2+}和肌酸放入 uMtCK 三维结构的催化活性中心，以此构建 uMtCK·ATP-Mg^{2+}·creatine 三元复合物的空间结构，进行 10 ns 的动力学模拟优化结构，得到与结合肌酸相关的作用位点为 R127、E227、Q313 和 R336，与结合 ATP 有关的氨基酸为 R125、R127、R231、R287、R315、V320 和 D330。将相应氨基酸突变为丙氨酸后，突变体 R127A、E227A 和 R231A 完全失去活性，突变体 R287A、R315A 和 R336A 相对于 uMtCK 活性仅在 20%以下，表明 R125、R127、E227、R231、R287、Q313、R315、V320、D330 和 R336 底物识别结合或底物催化过程中起关键作用，所以本文想通过丙

氨酸扫描实验并结合酶学实验数据，对上述位点进行更深入的酶学性质分析，以期分析上述位点在底物结合和催化过程中所发挥的作用。

最适温度的结果显示（图 4，a），突变酶 Q313A 的最适温度在 30 ℃，相比于野生酶的最适温度降低了 5 ℃，而突变体 R287A 的最适温度相比于野生型升高了 5 ℃，达到 40 ℃，其余突变体 R125A 和 R336A 的最适温度与野生型相同；最适 pH 的数据（图 4，b）表明突变体 R125A 的最适 pH 在 6.0，比野生型的最适 pH 低了一个单位，其余突变体的最适 pH 值与野生型的保持一致。实验数据表明将与肌酸和 ATP 结合相关的位点对 uMtCK 催化反应的最适温度和 pH 影响有限。同时对具有活性的突变体进行了酶动力学研究，实验结果表明突变体均不同程度降低了 uMtCK 对底物的亲和力和催化速度。其中与肌酸结合相关的 313 位的 Gln 突变为 Ala 后，K_m^{Cr} 提高了近 3 倍，表明突变体对肌酸的亲和力下降，同时 k_{cat} 也相较于野生型下降了 19%（表 1），证明突变体 Q313A 不仅影响对肌酸的结合，同时也降低了酶促反应的速度；同样地，与 ATP 结合相关的 R125A、R287A 和 R336A 突变体分别使得 K_m^{ATP} 数值升高了 3.2、4.2 和 2.6 倍，同时 k_{cat} 也相较于野生型分别下降了 72%、38%和 55%，说明突变体 R125A、R287A 和 R336A 不仅影响对 ATP 的结合，也同时降低了酶促反应的速度。

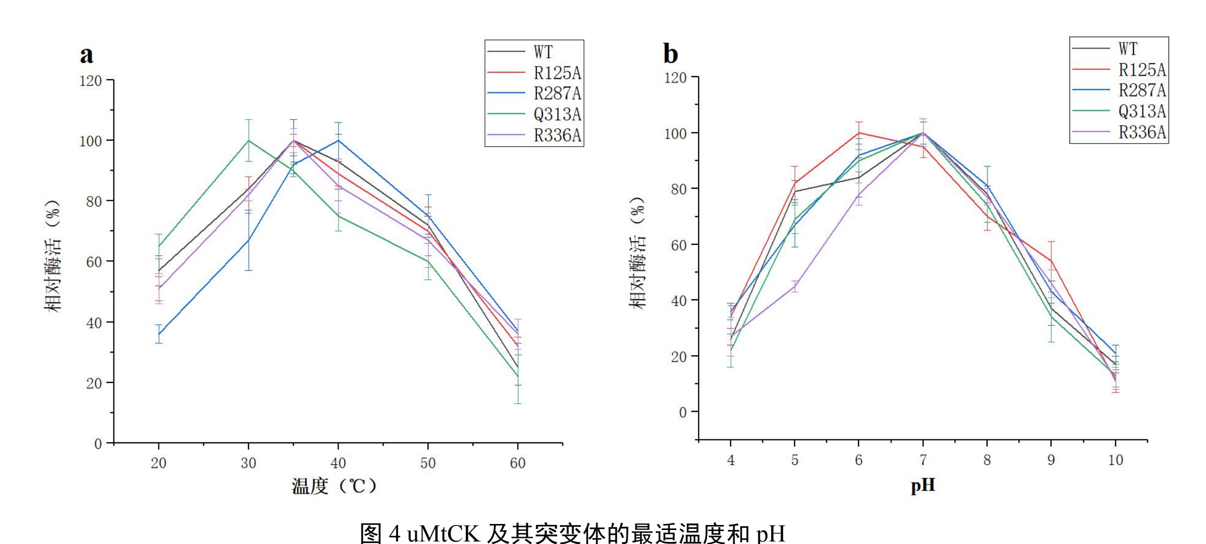


图 4 uMtCK 及其突变体的最适温度和 pH

Fig. 4 Effect of optimum temperature and pH on the acitivity of uMtCK and mutants

表 1 uMtCK 及突变体催化动力学常数

Table 1 Kinetic parameters obtained for uMtCK and mutants

	K_m^{Cr}（mM）	K_m^{ATP}（mM）	k_{cat}（s^{-1}）
uMtCK	11.2±0.5	1.4±0.2	47±1.7
R125A	16.2±0.9	4.5±0.4	13±0.9

R287A	13.7±1.5	5.9±1.2	29±2.2
Q313A	29.4±0.7	1.5±0.5	38±3.1
R336A	32.4±2.1	3.7±0.2	21±1.8

2.4 uMtCK 及其突变体圆二色谱的测定

由 WT、R125、R127、E227、R231、R287、Q313、R315、V320、D330 和 R336 二级结构的 CD 光谱（图 5）可知，各突变体的二级结构与野生型相比没有明显变化，通过分析软件 CDNN 2.1 计算野生酶和突变酶各二级结构所占的比例（表 2）的结果显示，与野生酶相比，各突变酶的二级结构没有明显的变化，即各突变位点没有引起 uMtCK 蛋白二级结构的变化。由于突变体 R127A、E227A、R231A、R287A、R315A 和 R336A 均完全或基本丧失活性，而相应的突变体二级结构均无明显的变化，说明这些位点的突变并未对蛋白的整体结构产生影响，活性的丧失更可能是由于突变使得相应位点空间结构发生变化而引起的。

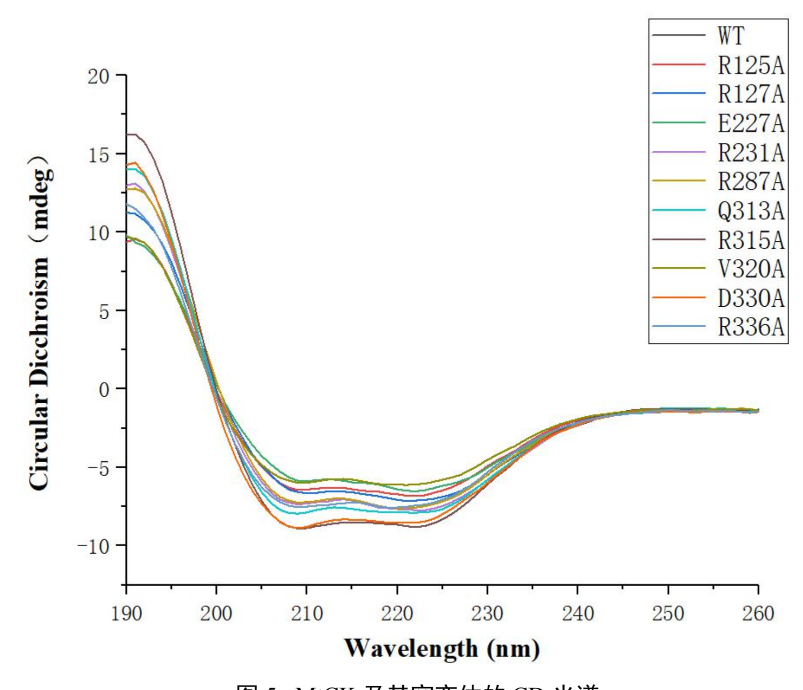


图 5 uMtCK 及其突变体的 CD 光谱

Fig. 5 Circular dichroism of uMtCK and mutants

表 2 uMtCK 及其突变体二级结构的含量

Table 2 The content of secondary structure in uMtCK and mutants

	WT	R125A	R127A	E227A	R231A	R287A	Q313A	R315A	V320A	D330A	R336A
Helix	25.1%	22.1%	23.7%	22.3%	24.9%	24.6%	25.2%	27.1%	21.3%	25.1%	23.0%
Antiparallel	12.2%	17.3%	15.0%	17.2%	13.0%	14.0%	12.7%	10.7%	19.0%	12.2%	15.4%
Parallel	6.5%	6.2%	6.4%	6.2%	6.6%	6.5%	6.5%	6.7%	6.0%	6.5%	6.2%
Beta-Turn	16.4%	17.3%	16.8%	17.2%	16.4%	16.7%	16.4%	16.0%	17.7%	16.4%	17.1%
Rndm Coil	36.6%	36.8%	37.4%	37.2%	37.5%	36.7%	36.8%	36.6%	35.9%	36.6%	36.3%

3 讨论

由于 uMtCK 蛋白结构的限制，为了催化反应的进行，ATP-Mg^{2+}和肌酸分别具有各自的优势构象，并且肌酸和 ATP 分别有各自的结合腔（图 6）。

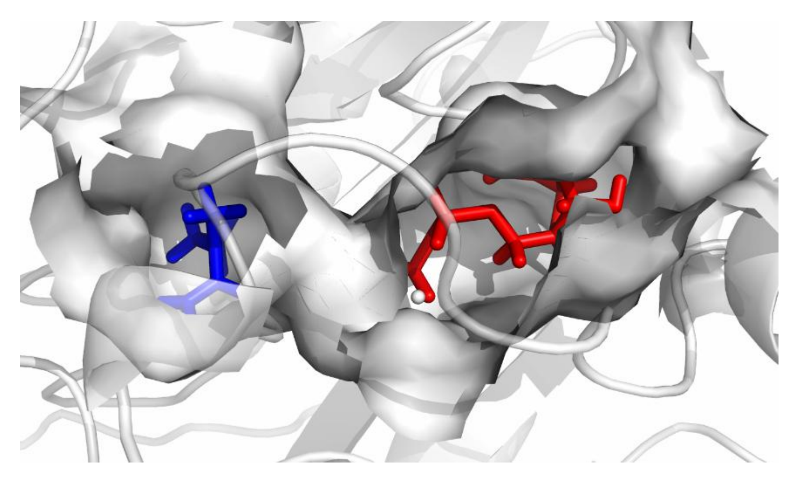


图 6 uMtCK 的肌酸和 ATP 底物结合腔

注：肌酸（蓝色），ATP（红色），图片由 PyMOL(https://pymol.org)生成

Fig. 6 A close-up view of creatine binding pocket and ATP binding site

Note: creatine (blue), ATP (red), the structural figure were generated with PyMOL (http://www.pymol.org)

肌酸的结合腔如图 7 a 所示，E227 的羧基与肌酸的胍基之间形成两个氢键，而已有晶体复合物报道的 TcCK[19]、RmCK[20]和 hBBCK[18]相对应位置的谷氨酸均与肌酸的胍基形成两个氢键，说明 E227 在肌酸激酶序列中高度保守且对于肌酸的结合也尤为重要。在 uMTCK-Mg^{2+}-ATP-creatine 空间结构中，R127、Q313 和 R336 均与肌酸的羧基形成氢键，这些关键氨基酸与底物的相互作用使得肌酸锚定在活性催化位置，可以对 ATP-Mg^{2+}进行亲核攻击。而 R127A、Q313A 和 R336A 破坏了这些与底物相互作用的氢键（图 7 b），使得突变体无法识别肌酸或不能在正确的位置固定肌酸，导致后续对 ATP 的亲核攻击无法进行，也就造成了突变体的失活；而与 ATP 结合有关的关键氨基酸中存在 5 个高度保守的精氨酸（图 7 c），这 5 个精氨酸在不同来源的 CK 中普遍存在，他们直接与 ATP 的磷酸基团有直接相互作用并稳定带负电的磷酸基团[15,18-20]，在 uMTCK-Mg^{2+}-ATP-creatine 空间结构中 R125 与 ATP 的 O_β、R127 与 ATP 的 O_γ 和肌酸羧基的氧原子、R231 与 ATP 的 O_γ、R287 与 ATP α-磷酸和β-磷酸基团之间的氧原子、R315 与 ATP 的 O_α和 O_γ均有氢键相互作用，这些相互作用组成了氢键作用网络从而帮助稳定带负电的磷酸基团，这与之前的研究相符。D336 和

V320 也与 ATP 之间有相互作用。我们推测这些氢键帮助肌酸和 ATP-Mg^{2+}处于反应发生的位置，使得磷酸转移可以发生。而将相应的氨基酸突变为丙氨酸后，这些关键氨基酸与 ATP 的氢键全部丧失（图 7 d），使得突变酶丧失对 ATP 的结合能力，也就导致 ATP 的高能磷酸基团无法转移至肌酸上。已有大量文献报道氢键在底物结合和催化发挥着重要的作用[15-20,27-29]，本文将 uMtCK 的 R125、R127、E227、R231、R287、Q313、R315、V320、D330 和 R336 突变为丙氨酸，在没有引起明显二级结构的改变下，会使 uMtCK 的活性大幅降低或丧失，通过三维结构的模拟对比发现氢键的缺失应是关键因素之一。

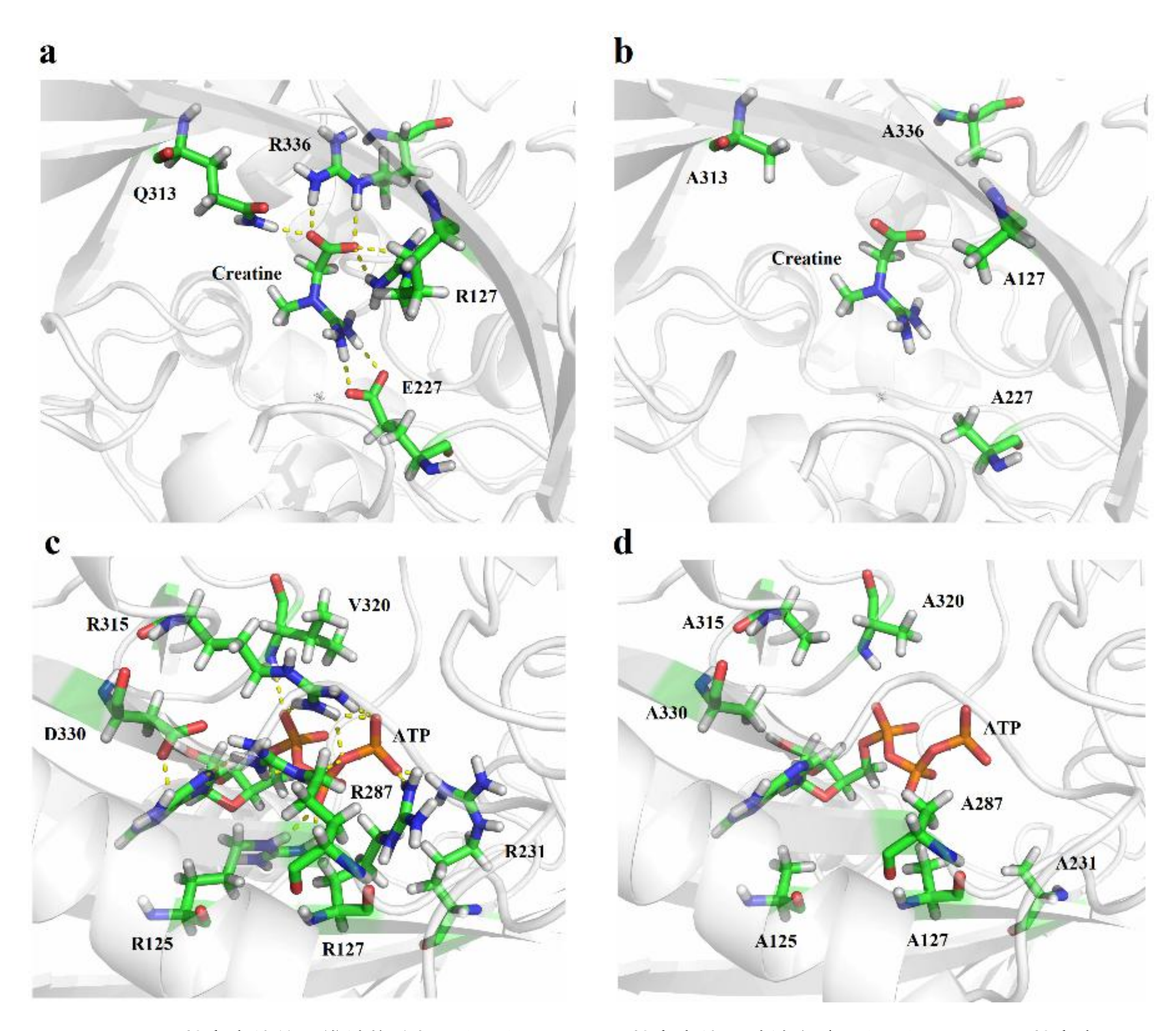


图 7 uMtCK 及其突变体的三维结构分析；（a, b）uMtCK 及其突变体肌酸结合腔；（c, d）uMtCK 及其突变体 ATP 结合腔；关键氨基酸为棒状模型，金色虚线表示氢键；图片由 PyMOL(https://pymol.org)生成

Fig. 7 Structural analysis of the uMtCK and mutants; (a, b) The models of the creatine and its surroundings; (c, d) The models of the ATP and its surroundings. The entire protein is shown in cartoon. ATP, creatine, and residues interacting with them are displayed in stick and labeled. The dotted lines indicate hydrogen-bonding network around the residue at creatine or ATP. The structural figures were generated with PyMOL (http://www.pymol.org)

4 结论

通过前期研究发现 uMtCK 的肌酸和 ATP 的结合位点，将这 9 个关键氨基酸相应地突变为丙氨酸，动力学实验显示突变体 R125A、R287A、Q313A 和 R336A 与野生酶相比，对相应底物 K_m 上升，k_{cat} 下降，圆二色谱结果显示突变体的二级结构无显著性变化，根据蛋白结构模拟结果我们推测氢键为底物识别和催化反应的关键相互作用。

参考文献

[1] Adams J E, Abendschein D R, Jaffe A S. Biochemical markers of myocardial injury. Is MB creatine kinase the choice for the 1990s?[J]. Circulation, 1993, 88(2): 750-763.

[2] Pepys M B, Hawkins P N, Booth D R, et al. Human lysozyme gene mutations cause hereditary systemic amyloidosis[J]. Nature, 1993, 362(6420): 553.

[3] Thomas P J, Qu B H, Pedersen P L. Defective protein folding as a basis of human disease[J]. Trends in biochemical sciences, 1995, 20(11): 456-459.

[4] Blacklow S C, Kim P S. Protein folding and calcium binding defects arising from familial hypercholesterolemia mutations of the LDL receptor[J]. Nature Structural & Molecular Biology, 1996, 3(9): 758-762.

[5] Wallimann T, Wyss M, Brdiczka D, et al. Intracellular compartmentation, structure and function of creatine kinase isoenzymes in tissues with high and fluctuating energy demands: the'phosphocreatine circuit'for cellular energy homeostasis[J]. Biochemical Journal, 1992, 281(Pt 1): 21.

[6] Armbruster D A. The genesis and clinical significance of creatine kinase isoforms[J]. Laboratory Medicine, 1991, 22(5): 325-334.

[7] Jacobus W E, Moreadith R W, Vandegaer K M. Control of heart oxidative phosphorylation by creatine kinase in mitochondrial membranes[J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 1983, 414(1): 73-89.

[8] Amamoto R, Uchiumi T, Yagi M, et al. The Expression of Ubiquitous Mitochondrial Creatine Kinase Is Downregulated as Prostate Cancer Progression[J]. Journal of Cancer, 2016, 7(1): 50.

[9] Qian X L, Li Y Q, Gu F, et al. Overexpression of ubiquitous mitochondrial creatine kinase (uMtCK) accelerates tumor growth by inhibiting apoptosis of breast cancer cells and is associated with a poor prognosis in breast cancer patients[J]. Biochemical and biophysical research communications, 2012, 427(1): 60-66.

[10] Mühlebach S M, Gross M, Wirz T, et al. Sequence homology and structure predictions of the creatine kinase

isoenzymes[J]. Molecular and cellular biochemistry, 1994, 133(1): 245-262.

[11] Eder M, Fritz - Wolf K, Kabsch W, et al. Crystal structure of human ubiquitous mitochondrial creatine kinase[J]. Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics, 2000, 39(3): 216-225.

[12] Rao J K M, Bujacz G, Wlodawer A. Crystal structure of rabbit muscle creatine kinase[J]. FEBS letters, 1998, 439(1): 133-137.

[13] Fritz-Wolf K, Schnyder T, Wallimann T, et al. Structure of mitochondrial creatine kinase[J]. Nature, 1996, 381(6580): 341.

[14] Eder M, Schlattner U, Wallimann T, et al. Crystal structure of brain - type creatine kinase at 1.41 Å resolution[J]. Protein Science, 1999, 8(11): 2258-2269.

[15] Tisi D, Bax B, Loew A. The three-dimensional structure of cytosolic bovine retinal creatine kinase[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2001, 57(2): 187-193.

[16] Bush D J, Kirillova O, Clark S A, et al. The structure of lombricine kinase: implications for phosphagen kinase conformational changes [J]. Journal of Biological Chemistry, 2011, 286(11): 9338-9350.

[17] Azzi A, Clark S A, Ellington W R, et al. The role of phosphagen specificity loops in arginine kinase[J]. Protein science, 2004, 13(3): 575-585.

[18] Bong S M, Moon J H, Nam K H, et al. Structural studies of human brain - type creatine kinase complexed with the ADP - Mg^{2+} - NO^{3-} - creatine transition - state analogue complex[J]. FEBS letters, 2008, 582(28): 3959-3965.

[19] Lahiri S D, Wang P F, Babbitt P C, et al. The 2.1 Å Structure of Torpedo californica Creatine Kinase Complexed with the ADP - Mg^{2+} - NO^{3-} - creatine Transition-State Analogue Complex[J]. Biochemistry, 2002, 41(47): 13861-13867.

[20] Ohren J F, Kundracik M L, Borders C L, et al. Structural asymmetry and intersubunit communication in muscle creatine kinase[J]. Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography, 2007, 63(3): 381-389.

[21] Borders C L, MacGregor K M, Edmiston P L, et al. Asparagine 285 plays a key role in transition state stabilization in rabbit muscle creatine kinase[J]. Protein science, 2003, 12(3): 532-537.

[22] McLeish M J, Kenyon G L. Relating structure to mechanism in creatine kinase[J]. Critical reviews in biochemistry and molecular biology, 2005, 40(1): 1-20.

[23] Ponticos M, Lu Q L, Morgan J E, et al. Dual regulation of the AMP - activated protein kinase provides a novel mechanism for the control of creatine kinase in skeletal muscle[J]. The EMBO Journal, 1998, 17(6):

1688-1699.

[24] Cantwell J S, Novak W R, Wang P F, et al. Mutagenesis of two acidic active site residues in human muscle creatine kinase: implications for the catalytic mechanism[J]. Biochemistry, 2001, 40(10): 3056-3061.

[25] Barbour R L, Ribaudo J, Chan S H. Effect of creatine kinase activity on mitochondrial ADP/ATP transport. Evidence for a functional interaction[J]. Journal of Biological Chemistry, 1984, 259(13): 8246-8251.

[26] Cook P F, Kenyon G L, Cleland W W. Use of pH studies to elucidate the catalytic mechanism of rabbit muscle creatine kinase[J]. Biochemistry, 1981, 20(5): 1204-1210.

[27] Edmiston P L, Schavolt K L, Kersteen E A, et al. Creatine kinase: a role for arginine-95 in creatine binding and active site organization[J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology, 2001, 1546(2): 291-298.

[28] Milner-White E J, Watts D C. Inhibition of adenosine 5′-triphosphate–creatine phosphotransferase by substrate–anion complexes. Evidence for the transition-state organization of the catalytic site[J]. Biochemical Journal, 1971, 122(5): 727-740.

[29] Li Q, Fan S, Li X, et al. Insights into the Phosphoryl Transfer Mechanism of Human Ubiquitous Mitochondrial Creatine Kinase[J]. Scientific reports, 2016, 6: 38088.

[30] Ho S N, Hunt H D, Horton R M, et al. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction[J]. Gene, 1989, 77(1): 51-59.